

Kutatási zárójelentés
a Biomolekulák mikrospeciációja című OTKA T 43579 pályázat teljesítéséről

Biológiai folyamatok molekuláris szintű megismerésének és gyógyászati befolyásolásának fontos, fiatal módszere a mikrospeciáció, mely nanosecundum egyedi élettartamú, ezért műszereinkkel el nem választható (coexisting), csak közvetve vizsgálható, de a kémiai és biokémiai folyamatokban egyedileg reagáló részecskékről nyújt információt, és amely érthetővé és tervezhetővé teszi hatóanyagok felszívódásának, membránpenetrációjának, receptorkötésének és lebomlásának számos részletét.

A témában 2002-ben elnyert, 2003-ban indult pályázatunk fő célkitűzései a következők voltak:

- A) Új típusú, az irodalomban le nem írt mikroszkópikus fizikai-kémiai mennyiségek bevezetése és meghatározása**
- B) Élettani vagy gyógyszer-tani jelentőségű molekulák jellemzése részecske-specifikus paraméterekkel**
- C) A mikro- és szubmikro speciáció körébe tartozó elvi, elméleti kérdések megválaszolása, meglévő módszerek kritikai értékelése**

A tárgyidőszakban végzett kutatómunkát a pályázatban megjelölt időzítéssel és résztvevőkkel, döntően tanítványaimmal végeztük, az alábbi eredményekkel:

A/1 Rotamer-specifikus megoszlási hányados meghatározása

Többféle konformer (rotamer) állapotban előforduló molekulák a vizes és szerves fázis között is többféle rotamer állapotokban oszlanak meg. Ennek igen nagy jelentősége van élő szervezetekben az alapvetően vizes közeget képviselő vér és a döntően lipid sejtmembrán, illetve a szintén lipid központi idegrendszer közti megoszlásban.

Korábbi munkánkban (Noszál, Kraszni: Conformer-Specific Partition Coefficient: Theory and Determination, *J. Phys. Chem B.* 2002, 106, 1066-1068) kidolgoztuk a rotamer-specifikus megoszlási hányados meghatározásának elvét, vizsgálati rendszerét és számítási menetét, melyet egy gyógyszerként és doppingszerként egyaránt ismert molekulán a gyakorlatban is kivitelezünk.

(Kraszni M., Bányai I., Noszál B.: Determination of Conformer-Specific Partition Coefficients in Octanol/Water Systems *J. Med. Chem.* (2003) 46 2241-2245 I.f.: 4.82)

A/2 Észter hidrolízis jellemzése mikroszkópikus sebességi állandókkal

Az észter hidrolízis sebességét jól ismert külső körülmények (pH, oldószer, hőmérséklet) és kevésbé ismert intramolekuláris tényezők befolyásolják, mely utóbbiak közé tartozik az észter csoport környezetében lévő savas/bázikus csoport(ok) protonáltsági állapota és ezek hatása az észter csoport elektronsűrűségére. Nagyobb számú (pl. n db) környező csoport esetén az észtercsoport állapotainak száma, egyben reakciókészsége 2^n számú diszkrét értéket vesz fel, melyeknek kezelését és a

jellemzésükre szolgáló sebességi mikroállandók meghatározását korábban az irodalomban nem írták le.

Munkánkban definiáltuk az észter hidrolízis sebességi mikroállandóit, levezettük összefüggéseit, di- és trifunkciós aminosav-észterek példáján bemutattuk meghatározását.

(Noszál, B., Visky, D., Kraszni, M.: Characterisation of Ester Hydrolysis in Terms of Microscopic Rate Constants *J. Phys Chem B* 2006, 110, 14507 – 14514 I.f.: 4.033)

B/1 Az oxidált glutation (GSSG) csoportspecifikus sav-bázis tulajdonságainak meghatározása

Míg a szervezetet érő oxidatív stressz kivédésében kulcsszerepet játszó redukált-oxidált glutation rendszer (GSH/GSSG) redukált komponensének mikroszkópikus sav-bázis kémiája ma már a témakör klasszikusai közé tartozik, addig a GSSG hasonló jellemzése a nagy csoportszám okán ill. megfelelő kiértékelő módszer hiányában nem történt meg. Ezért a csoportszám által megkövetelt elvi kérdések tisztázása után meghatároztuk a GSSG 4 karboxilát (továbbá a sokkal kevésbé problematikus 2 amino) csoportjának protonálódási állandóit és a köztük érvényes kölcsönhatási tényezőket.

(Noszál, B., Szakács, Z.: Microscopic protonation equilibria of Oxidized Glutathione

J. Phys. Chem. B 2003, 107 (21): 5074-5080 I.f.: 3.679)

B/2 Fólsav, metotrexát és rokonvegyületeik sav-bázis tulajdonságainak jellemzése

A magzatvédő vitaminként is javallott, mintegy hetven éve ismert fólsav, valamint a daganatellenes terápiában több évtizede használatos metotrexát sav-bázis tulajdonságait a vegyületek bonyolult szerkezete és nagy aggregációs hajlama miatt nem határozták meg. Munkánkban több metodika és származék vegyület bevonásával derítettük fel a csoport-specifikus sav-bázis tulajdonságokat. Nyomással segített kapilláris elektroforézist (PACE) alkalmaztunk a fólsav és nyolc származéka összes pK értékének meghatározására. Ez a módszer alacsony ($\leq 0,1$ mM) koncentrációnál tette lehetővé a savi disszociációs állandók mérését, így az önasszociáció és a fotokémiai bomlás a teljes pH-tartományban elkerülhető volt. Az állandók helyességét független ^1H NMR-pH, UV-pH és potenciometriás titrálásokkal igazoltuk és a mért értékeket fiziológiás ionerősségre konvertáltuk. Eredményeink alátámasztják, hogy akár három átfedő pK érték is megfelelő pontossággal ($< 0,06$) és torzítatlanul határozható meg CE titrálással, ha nem törekszünk a divatos, gyors *high-throughput* analízisre. A PACE módszer kísérleti szempontjait elemeztük sav-bázis tulajdonságok vizsgálatára. A fólsavra és metotrexátra kapott csoportspecifikus bázicitásadataink azt mutatják, hogy a vegyületek látszólag csekély konstitúciós különbsége jelentős változáshoz vezet az analóg csoportok protonaffinitásában, különösen a pteridin N^1 atom esetén. Ez magyarázatul szolgál a két vegyület dihidrofolát reduktázhoz való eltérő kötődésére, mely a metotrexát daganatellenes terápiában való használhatóságának molekuláris alapját képezi.

(Szakács, Z., Noszál, B.: Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis *Electrophoresis* 2006. 27, 3399-3409 I.f.: 3.85)

B/3 Az imatinib (Gleevec®) sav-bázis kémiája és ezen alapuló intermolekuláris kölcsönhatások vizsgálata

B/3/a Az imatinib (Gleevec®) és alkotórészei sav-bázis kémiája

Az imatinib (Gleevec®, 4-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamid) az új koncepciójú rákkutatás legsikeresebb, áttörést jelentő vegyülete, mely mára a krónikus myeloid leukaemia (CML) terápiájának szuverén hatóanyagává vált. A molekulának, valamint két fragmensének csoport-specifikus bázicitását jellemeztük potenciometriás és NMR-pH titrálásokkal. A meghatározott makro-, mikro- és csoportállandók alapján a nitrogének protonálódása az N^{34} , N^{11} , N^{31} , N^{13} sorrendben történik, ahol N^{11} és N^{31} bázicitása összemérhető, de molekulán belüli kölcsönhatásuk elhanyagolható. Ezt a protonálódási szekvenciát alátámasztják az imatinib molekula két „felét” reprezentáló két modellvegyületre mért bázicitásadatok is. A kapott állandók alapján részecskeeloszlást számítottunk a szervezet eltérő pH-jú megoszlási tereire.

(Szakács Z., Béni Sz, Varga Z., Örfi L., Kéri Gy, Noszál B.: Acid-Base Profiling of Imatinib (Gleevec®) and Its Fragments *J. Med Chem.* 2005, 48, 249 – 255, I.f.: 4.926)

B/3/b Az imatinib (Gleevec®) liposzóma-komplex képzése

Protonálódási vizsgálataink kimutatták, hogy az imatinib molekula a szervezet egyes kompartmentjeinek pH-ján legalább 1 pozitív töltéssel rendelkezik, ami jelentős akadálya a membránokon való átjutásnak, így magyarázza a vegyület szerény biohasznosíthatóságát. Az imatinib farmakokinetikai tulajdonságainak javítása, a célmolekulához való irányított eljuttatása megfelelő hordozó segítségével tervezhető, melyben a hordozóval való kölcsönhatások molekuláris-szubmolekuláris szintű megismerése igen fontos állomás. Ezért liposzóma-imatinib formulálást végeztünk és vizsgáltuk a liposzóma-membránon belüli molekuláris kölcsönhatásokat. Multilamelláris (MLV) és unilamelláris (SUV) liposzómákat állítottunk elő dipalmitoil-foszfátidilkolin (DPPC) felhasználásával. Az imatinib DPPC membránra gyakorolt hatását elektron-paramágneses rezonancia (EPR) és differenciál-pásztázó kalorimetria (DSC) módszerekkel vizsgáltuk 5.2 ill. 9.0 pH mellett, ahol az imatinib rendre monokationos ill. semleges. Vizsgálataink azt mutatják, hogy az imatinib elsősorban a liposzóma fejcsoportjaival lép kölcsönhatásba, MLV esetén azok mozgékonyosságát növeli. Ezzel szemben, SLV-k esetében jelentősen csökkenti a liposzómák fluiditását, mely pH-függő fúziós-szegregációs hatásként értelmezhető. Ezen eredmények jelentősége abban rejlik, hogy az imatinib liposzómákkal megfigyelt erős kölcsönhatása és a liposzóma tulajdonságaira gyakorolt jelentős változtató-hatása feltehetően nemcsak liposzómán, mint mesterséges, az élő szervezet membránjait modellező anyagon érvényesül, hanem magán az élő membránon is.

(Béni, S., Budai, M., Noszál, B., Gróf, P.: Molecular interactions in imatinib-DPPC liposomes *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006. (27) 205–211 I. f.: 2.347)

B/3/c Az imatinib (Gleevec®) ciklodextrin komplex-képzése

A hatását sejten belül kifejtő imatinib farmakokinetikai tulajdonságainak javulása ciklodextrin komplex-képzésétől is várható. Ezért egyensúlyi és szerkezeti vizsgálatokat végeztünk béta-ciklodextrin (CD) és random-metilezett béta-ciklodextrin (RAMEB) gazdamolekulák és a különböző mértékben protonált imatinib formák kölcsönhatásának jellemzésére, fázis-oldhatóság, pH-potenciometria, elektron-spray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) és mágneses magrezonancia spektrometria (¹H NMR ROESY) technikák felhasználásával, melyekkel az 5 különböző töltésű komplex stabilitási állandóját és az egyes asszociátumok szerkezeti paramétereit meghatároztuk.

(Szabolcs Béni, Zoltán Szakács, Orsolya Csernák, Lajos Barcza, Béla Noszál: Cyclodextrin/imatinib complexation: Binding mode and charge dependent stabilities *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007, 30, 167-174., I.f.: 2,347)

B/4 Szokatlan bázicitású, nagy gyógyászati jelentőségű molekulák (6-amino penicillánsav, 7-amino kefalosporánsav, tenoxikám) kovalens módosítása és mikrospeciációja

B/4/a Tenoxikám-származékok szintézise és vizsgálata

Az ismert nemszteroid gyulladásgátló (NSAID) hatóanyag, a tenoxikám (4-hydroxy-2-methyl-N(pyridin-2-yl)-2H-thieno[2,3-e][1,2]thiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide) nitrogénen- és oxigénen szubsztituált származékait szintetizáltuk és különböző kémiai átalakítási lehetőségeiket vizsgáltuk. Az 1'-metilténnoxikám szelektív hidrolíziseit és reakcióit tanulmányoztuk, valamint új O-acil-származékokat, mint potenciális előgyógyszereket (prodrug-okat) állítottunk elő. A 4-klór származékokat új tetra-és triciklusos gyűrűrendszerekké transzformáltuk. Utóbbi egy konformációsan feszített 1,5-diaril-pirazol, mely potenciális COX-2 inhibitor.

Származékképzéssel modellvegyületeket állítottunk elő a tenoxikám protonálódás minor útvonalában résztvevő részecskékre, mely lehetővé tette a tenoxikám, egy szokatlanul alacsony bázicitású enolát csoportot tartalmazó molekula valamennyi mikroállandójának a meghatározását. Utóbbi munka jelenleg közlésre előkészített állapotban van.

(Kóczian, K., Kökösi, J., Mazák, K., Noszál, B.: Novel Chemical Transformations of Tenoxicam *Helv. Chim. Acta* 2005, 88 (8): 2355-2363., I.f.: 1.65)

B/4/b Béta-laktám antibiotikum magmolekulák módosítása és jellemzése

A 6-amino-penicillánsav (6-APA) ill. a 7-aminokefalosporánsav (7-ACA) a prekursor nélküli penicillin ill. kefalosporin szintézis terméke és a 2 legismertebb antibiotikumcsalád alapmolekulája. Jelentőségük ellenére csoport-specifikus sav-bázistulajdonságaikat nem írták le, mert a béta-laktám gyűrű bomlékonysága és a funkciós csoportok jelentősen eltérő bázicitása megakadályozta mikrospeciációjukat. Az általunk előállított észterek és az anyavegyületek NMR-pH titrálása azonban lehetővé tette a bomlatlan molekulák protonáltsági állapotának követését, a 6-APA, és a 7-ACA mikrospeciációját. Különösen érdekesnek adódtak az amino csoportok protonálódási állandói, melyek igen alacsony, 4 és 5 logK egység közti bázicitást

képviselnek, kiváltképp a 7-ACA $\log k_c^N = 4.12$ értéke, ami tudomásunk szerint a legkisebb (nem aromás) amino bázicitás az ismert vegyületek körében. (Kóczián K., Szakács Z., Kökösi J., Noszál B.: Site-specific protonation microequilibria of penicillin and cephalosporin beta-lactam core molecules *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2007, közlésre benyújtva, I.f.: 2.347 (2005-ös)

B/5 Lokális vizesítő és víz-szegényítő hatás vizsgálata karboxilátcsoportot tartalmazó vegyületek oldalláncainak hatására víz-dioxán oldószerkeverégekben. Módszer a vizesítő hatás mértékének becslésére

Dioxán-víz rendszerben vizsgáltuk karboxilát csoportot tartalmazó vegyületek családjának változatos oldallánccal rendelkező tagjait. Tanulmányoztuk a karboxilát-bázicitás mérhető értékének oldószer-függését, korrelációt találtunk a mért $\log K$ érték és az oldószer-összetétel között, melynek alapján módszert dolgoztunk ki a karboxilát-csoport környezetében lévő helyi oldószer-összetétel (más módszerrel tudomásunk szerint nem meghatározható értékének) becslésére. Referenciaként az acetát-iont alkalmazva kimutattuk, hogy erős környezeti vízdúsító hatást fejt ki az ammónium-csoport, közepeset a peptid-csoport, valamint a tiol-csoport. Ugyanakkor, a metilén-csoport(ok) számának növekedtével bekövetkező lánchosszabbodás mérsékelt mértékű dioxán-koncentráció növekedést, ezzel lokális vízkoncentráció-csökkenést okoz.

(Nyíri J., Noszál B.: Neighbour Group Hydration Effects on Carboxylate Basicities in Partly Aqueous Solutions *J. Sol. Chem.* 2005, 34(11) 1227-1233, I.f.: 0.983)

B/6 N-metil aszparaginsavnak és amidjainak szintézise, az N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) mikrospeciációja

Az NMDA az excitatorikus glutamát receptorok egyik fő típusának endogén liganduma, melynek legbázikusabb formája szekunder amino, valamint α - és β -karboxilát csoportokkal rendelkezik. A makromolekuláris fehérje NMDA receptor konformációjának pH-függését már leírták, ugyanakkor nem rendelkezünk adatokkal az NMDA pH-függő állapotairól. Ezért megvalósítottuk az NMA-nak és 3 amidjának (diamid, α - és β -monoamid) új szintézisét és az amidok, valamint az anyavegyület ^1H NMR-pH titrálásával, többféle kiértékeléssel meghatároztuk az NMA (NMDA) mikroállandóit.

(Boros, M., Kökösi, J., Vámos, J., Noszál, B.: Site-specific acid-base properties of N-methyl-D-aspartic-acid and related compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1306–1314., I.f.: 1.889 (2005-ös)

Boros, M., Kökösi, J., Vámos, J., Kövesdi, I., Noszál, B.: Methods for syntheses of N-methyl-DL-aspartic acid derivatives. *Amino Acids* (2007) 00: 1–9., I.f.: 2.172 (2005-ös)

B/7 A folkodinnak és néhány származéknak kovalens módosítása, makro- és mikrospeciációja

A köhögéscsillapító hatású, morfin- ill. kodein-származékként számon tartott folkodinnak, valamint néhány rokonszerkezetű vegyületnek, köztük főbb metabolitjainak protonálódási egyensúlyait leíró makro- és mikroállandókat ^1H NMR-

pH titrálással határoztunk meg. Új, részben kvaterner *N*-metil származékokat szintetizáltunk, hogy a csoport- és magspecifikus ^1H NMR protonálódási eltolódásokat megállapítsuk, majd felhasználásukkal a makro- és mikroegyensúlyi paramétereket meghatározzuk. A folkodin illetve a norfolkodin esetén a piridin gyűrűben lévő nitrogén 38-szor illetve 400-szor bázikusabbnak bizonyult, mint a morfolin nitrogénje. A folkodin molekulának a protonálódási állandók ismeretében kiszámított átlagos töltése fiziológiás pH – n +1,07, mely kationos jelleg csökkenti a molekula központi idegrendszerbe történő belépési esélyét, ami magyarázatot nyújt arra, hogy alkalmazása során miért marad el a morfin származékoknál közismert analgetikus hatás és hozzászokás.

(Kovács Zs., Hosztafi S., Noszál, B.: Site-specific acid-base properties of pholcodine and related compounds
Anal. Bioanal. Chem. 2006, 386, 1709-1716., I.f.: 2.695 (2005-ös))

C/1 A mikroállandók meghatározhatósága a csoportszám és a szimmetria összefüggéseinek függvényében. Az első négycsoportos, átfedő protonálódású molekulán végzett experimentális mikrospeciáció

Irodalmi újdonságként kimutattuk, hogy háromnál több (n számú) csoport esetén a teljes mikrospeciáció nemcsak a részecskeszám exponenciális (2^n), vagy az állandószám azt is meghaladó ($n \cdot 2^{n-1}$) növekedése arányában bonyolultabb, hanem az elhanyagolások alacsony szintjén – meglepő, de igazolható módon – elvileg sem lehetséges, hacsak egyszerűsítő körülmény (pl. szimmetria) nem teszi ezt lehetővé. Az oxidált glutation (GSSG) példáján, a molekulában lévő szimmetria-adta azonosságok feltárásával és kihasználásával elvégeztük az első olyan mikrospeciációt, melyben 4 átfedő protonálódású csoport sav-bázis tulajdonságainak és kölcsönhatásainak kompromisszumok nélküli, experimentális alapú jellemzése történt.

(Noszál, B., Szakács, Z.: Microscopic protonation equilibria of Oxidized Glutathione *J. Phys. Chem. B* 2003, 107 (21): 5074-5080 I.f.: 3.679)

C/2 A mikroszkópikus sav-bázis tulajdonságok NMR-pH titráláson alapú meghatározásának kritikai összefoglalása

A bio-, gyógyszer- és kábítószer molekulák szerkezetbeni sorsának és kölcsönhatásainak feltételeit megszabó molekuláris/szubmolekuláris bázicitás jellemzésének napjainkra leggyakoribb módszere az NMR-pH titrálás, melynek elveiről és módszereiről jelentősége ellenére a közelmúltig nem jelent meg kritikai összefoglaló. Az Analytical and Bioanalytical Chemistry felkérése alapján írt munkánkban áttekintettük a mikrospeciáció csoportszámtól és molekulaszimmetriától függő lehetőségeit és korlátait, a meghatározás kísérleti szempontjait, a leggyakoribb NMR magok (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N) kémiai eltolódásának elektronsűrűség-függését, a mikroegyensúlyok értékelésének alapelveit, a legfontosabb bioligandumok (aminosavak, oligopeptidok, szénhidrátok, nukleinsav-alkotók, komplexonféleségek, dendrimerek, nyíltláncú és ciklikus poliaminok) protonálódásának követését. Külön fejezet foglalkozik a polipeptidok és fehérjék funkciók csoportjainak jellemzésével.

(Szakács Z., Kraszni M., Noszál B.: Determination of microscopic acid-base parameters from NMR-pH titrations *Anal Bioanal. Chem.* 2004 378 1428-1448 I.f.: 2.098)

C/3 Rotamer populációk és egyéb rotamer-specifikus fizikai-kémiai paraméterek meghatározása NMR csatolási állandókból

Biológiai folyamatok sebességét és egyensúlyait, sőt, a termékek minőségét makromolekulák esetében a konformáció, kismolekuláknál a rotamer állapot jelentősen befolyásolja. A rotamer populációk és az ebből levezethető egyéb paraméterek feltárásának szuverén módszere az NMR csatolási állandók meghatározása. Az erről írt kritikai összefoglalónk áttekinti a vicinális csatolások és a diéderes szög összefüggéseit, a diszkrét modellen alapuló rotamer analízis lehetőségeit, a Karplus összefüggésen alapuló egyenletek felhasználhatóságát nyíltláncú rendszerek, valamint öt- és hattagú gyűrűk esetén. Külön fejezet foglalkozik a folyamatos modellen alapuló rotamer-eloszlással, továbbá a rotamer-specifikus bázicitással és megoszlási hányadossal.

(Kraszni M., Szakács Z., Noszál B.: Determination of rotamer populations and related parameters from NMR coupling constants: a critical review *Anal Bioanal. Chem.* 2004 378 1449-1463 I.f.: 2.098)

C/4 A hisztamin, mint biológiai ágens szubmolekuláris jellemzése

A korábbi közleményünkben (Kraszni, M., Kökösi, J., Noszál, B.: Concentration and Basicity of Histamine Rotamers *J. Chem. Soc. Perkin II.* 2002, 914-917) protonáltsági és konformációs szempontból részletesen kvantifikált hisztamin molekuláris tulajdonságait az élő szervezetben való viselkedés szempontjából jellemeztük, különös tekintettel a receptorkötésben való részvételre. Ennek lényege, hogy az a tény, mely szerint a hisztamin jelenleg ismert 4 receptorának más-más agonistái és antagonistái vannak, mutatja, hogy e receptorkötésekben a hisztamin molekula eltérő protonáltsági és/vagy konformációs állapotban vesz részt.

(Noszál B., Kraszni M., Rácz Á.: Histamine: Fundamentals of Biological Chemistry pp. 15-28 Könyvrészlet in: Histamine: Biology and Medical Aspects (szerk.: Falus, A., Springer, Karger, 2004)

Budapest, 2007. február

Dr. Noszál Béla